

ムギ類赤かび病菌 (*Fusarium graminearum* Schwabe) における分生子の大量培養法

金 谷 良 市・武 田 和 義

緒 言

ムギ類の赤かび病はフザリウム菌の一種である赤かび病菌 (*Fusarium graminearum* Schwabe, 完全世代は *Gibberella zeae* Petch) が感染して起こる病害で、作物の品質・収量を低下させるだけでなく、食中毒の原因となるかび毒を生じる事が知られており、わが国におけるオオムギおよびコムギの重要病害の一つとなっている (Pugh *et al.* 1933, 西門 1958, 一戸 1978). 本病害の第一次感染源は子のう胞子であり、胞子の飛散と発芽には水が必要なので、開花期前後の気象条件が赤かび病発生の支配的要因であるとされている (井上・西門 1959).

以前は大量の材料に対する正確な菌接種が難しかったこともあって本病害に対する抵抗性遺伝子源の探索や遺伝分析に関する研究は少なかったが、最近、大量検定に適した方法が開発され、オオムギについては抵抗性遺伝子源の検索 (武田・部田 1989) や遺伝分析 (武田 1990) が行われるようになってきた。

接種試験を行う際には接種源となる胞子を安定して大量に得るための培養方法を確立しておくことが重要な条件となる。しかし、本病原菌におけるこの方面の研究は少なく、簡便で確実な大量培養法はまだ確立されていない。子のう胞子を得るには、長期の培養期間 (50日以上) を必要とし、また、子のう殻形成には日長および温度に特別の条件が要求される (部田 1990)。一方、分生子はジャガイモ煎汁寒天培地などを使った平面培養でも形成され、子のう胞子に比べれば比較的扱いやすいと考えられるので、分生子の大量培養法の開発を目的として、いくつかの実験を行い、従来法に比べて非常に簡便な培養方法を開発したので報告する。

本実験で供試した菌株は芳沢宅実、齊藤初雄、沢田壮兵、部田英雄の諸氏より提供いただいた。ここに記して謝意を表します。

材料および方法

実験 1～8 の供試材料は当研究所で保存している約 250 菌株の中から無作為に選んだ 10 菌株 (Table 1) で、実験によってこのうち 5～10 菌株を用いた。実験 9 の供試材料は前述

の250菌株のうち1983に倉敷市および総社市で採取・分離された75菌株である。

各実験における分生子の形成程度の調査およびその評価は次のように行った。

平面培養の場合は菌叢片(約2 mm 角)をスライドガラス上に置いて水を1滴たらし、菌叢片を軽く押しつぶして水滴中に遊離してきた分生子の量を顕微鏡下で観察し、顕微鏡150倍1視野内に分生子が全くみられないものを0, 1~10個を1, 11~30個を2, 31~100個を3, 100個以上を4として5段階で評価した。一方、液体振盪培養の場合は培養液を1滴スライドガラスに取り、その液中の分生子の量を前述の規準に従って評価した。以下各実験ごとに材料と培養方法について述べる。

実験1. 平面培養における培地条件

Table 1に示した10菌株を5種類の培地条件で培養し、培養開始21日目に分生子の形成程度を調査した。供試した培地はフザリウム菌の分生子形成に好適とされている改変ペプトン培地(齊藤・堀 1985), Park の培地 (Park 1961), および改変 Bilai の培地 (Joffe 1963), イネのいもち病菌 *Pyricularia oryzae* Cavara. の分生子形成用培地として開発された見里・原の培地(見里・原 1957), ならびに菌類の培養に最も一般的に用いられているジャガイモ煎汁寒天培地(PDA 培地)を用いた。その培地組成を Table 2に示す。これらの培地は直径9 cm のペトリ皿に20ml ずつ分注して平面培地とし、1区1ペトリ皿として2反復を設けた。

Table 1. List of strains

Strain	Origin	Year	Source
21	Okayama	1983	Okayama university
50	"	"	"
78	"	"	"
G 6	Miyazaki	1942	"
G 9	Okayama	1955	"
1360	Kagawa	—	Kagawa university
1361	Kagawa	—	"
S 1	—	—	Kyusyu, Agr. Exp. Sta.
H27	Hokkaido	1985	Okayama university
H45	"	"	"

Table 2. List of media

Media	Composition (ingredients per liter)
Potato Dextrose Agar (PDA or PD)	Potato, infusion from 200g Glucose, 20g (Agar 15g)
Modified Peton	KH ₂ PO ₄ , 7.5g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 3.5g Polypepton, 2.5g Glucose, 5.0g (Agar 20g)
Park	MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.5g KH ₂ PO ₄ , 0.2g NH ₄ NO ₃ , 0.1g Glucose, 0.7g (Agar 15g)
Modified Bilai	KH ₂ PO ₄ , 1.0g KNO ₃ , 1.0g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.5g KCl, 0.5 g Soluble starch, 0.2g Glucose, 0.2g Saccharose, 0.2g (Agar 15g)
Misato-Hara	Yeast extract, 2.0g Soluble starch, 10g (Ager 15g)

Agar was used only for plate culture.

実験 2. 温度条件

温度条件を10, 15, 20, 25および30℃の5段階に設定し, Table 4に示した5菌株を供試して各温度条件における分生子形成程度を調査した. 培地には PDA 培地を用い, 実験には2反復を設けた. 培養は白色蛍光灯の12時間日長で行い, 培養開始21日目に分生子の形成程度を調査した.

実験 3. 日長条件

白色蛍光灯の照明時間を1日当り0, 12および24時間の3段階に設定し, それぞれの条件における分生子形成程度を培養開始21日目に調査した. なお, 培養温度は25℃とし, 供試菌株, 培地条件および反復数は実験2と同様である.

実験 4. 菌糸除去処理

Table 6に示した6菌株を PDA 培地で培養し, 菌糸がペトリ皿のほぼ全面に広がった培養4日目に白金耳で菌糸を除去し, 除去処理後1日おきに7日目まで経時的に分生子の形成程度を調査した. なお, 菌糸の除去処理を行わなかったものを対照区とし, それぞれ2反復を設けた.

実験 5. 培養中の培地条件の変更処理

実験4と同じ6菌株を供試し, 培養の途中で培地条件を変える処理を行った. PDA 培地上に滅菌したろ紙を敷き, その上に菌叢片を置床して菌糸がろ紙上ほぼ全面に広がった培養開始後6日目にろ紙を PDA 培地から剝離し, 菌糸ごと素寒天培地(寒天12g/1000ml)に置床した. 素寒天培地に置床してから1日おきに7日目まで分生子形成程度を調査した. なお, PDA 培地から PDA 培地に移し変えたものを対照区とし, それぞれ2反復を設けた.

実験 6. 液体振盪培養における培地条件

実験1の平面培地で用いたものと同じ5種類の培地から寒天を除いて液体培地とし, 100 mlの三角フラスコに30ml ずつ分注した. それらに PDA 培地で培養中の10菌株(Table 1)の菌叢片を植え付け, 1分間に135往復の振盪速度で振盪培養し, 培養開始14日目に分生子形成程度を調査した. 1区1フラスコとして反復は設けなかった.

実験 7. 振盪速度

Table 9に示す9菌株を供試して 振盪速度を, 毎分0, 60, 90および135往復の4段階に設定し, それぞれの振盪速度における分生子形成程度を培養開始の翌日から1日おきに7日目まで経時的に調査した. 改変 Bilai の培地を用い, 2反復を設けた.

実験 8. 液体培地の pH

水酸化ナトリウムと塩酸を使って培地の pH を 3, 5, 6, 7, 8, 10および12の7段階に調整し, それぞれの pH 条件における分生子形成程度を培養開始7日目に調査した. Table 10に示す7菌株を供試し, 改変 Bilai の培地を用いて2反復を設けた.

実験 9. 菌株間差異

当研究所で保存している約250菌株の中から75菌株を PDA 平面培地で培養し, 培養開始21日目に分生子形成程度を調査した. さらに, 同じ75菌株を, pH 無調整(pH 5~6)および pH 8に調整した改変 Bilai の培地で振盪培養し, 培養開始7日目に分生子形成程度を調査した. 反復は設けなかった.

結果および考察

実験 1. 平面培養における培地条件

各培地における分生子形成指数を Table 3 に示す。改変 Bilai の培地ではいずれの菌株も分生子を形成せず、また菌糸の伸長も他の培地に比べて極端に悪かった。Park の培地では PDA とほぼ同程度の分生子形成がみられた。しかし、Park の培地に対する各菌株の反応は PDA の場合と多少異なり、PDA では分生子形成の殆ど見られない No. 21 でも若干の分生子が形成され、逆に PDA では多量の分生子を形成する G 9 はほとんど分生子を形成しなかった。

一方、改変ペプトンおよび見里・原の培地では PDA 培地とほぼ同程度、菌株によっては PDA 培地よりも多量の分生子が形成され、例えば、H27 では PDA 培地における分生子形成指数が 2.5 であったのに対し改変ペプトン培地および見里・原の培地では 4 と最高値を示した。

Table 3 で明らかのように、平面培養においては菌糸そのものがほとんど伸長しない改変 Bilai の培地を除けば、分生子の形成は培地組成によってあまり変化しなかったもので、以下の平面培養には菌類の培養に最も一般的な PDA 培地を用いることにした。

なお、No. 78, G 9, 1361, H27 および H45 は改変 Bilai 以外のいずれの培地でも分生子を形成する一方、G 6 や S 1 などはいずれの培地でも分生子を形成しないので、分生子形成能力は菌株の遺伝的特性とみられる。

実験 2. 温度条件

Table 4 に 5 つの温度条件における各菌株の分生子形成指数を示す。No. 78 と 1361 の 2 菌株はいずれの温度条件でも分生子を形成し、他の 3 菌株はいずれの条件でも形成しなかった。分生子形成の最適温度は 25~30℃ の間にあるとみられた。

齊藤・堀 (1985) は赤かび病菌 3 菌株を用いて、分生子形成の最適温度は 25℃ 前後にあ

Table 3. Conidia formation by plate culture for ten strains of *F. graminearum* in five media

Strain	Medium					Mean
	PDA	Pepton	Park	Bilai	M.H.	
21	0	0.5	2.0	0	0	0.5
50	0.5	0	0	0	1.5	0.4
78	2.5	2.5	3.0	0	4.0	2.4
G 6	0	0	0	0	0	0
G 9	4.0	2.5	1.0	0	4.0	2.3
1360	0	1.5	0	0	0	0.3
1361	4.0	3.0	4.0	0	4.0	3.0
S 1	0	0	0	0	0	0
H27	2.5	4.0	4.0	0	4.0	2.9
H45	2.5	4.0	2.0	0	2.0	2.1
Mean	1.6	1.8	1.6	0	2.0	1.4

Conidia formation score, 0 : none ~ 4 : heavy, throughout the paper.
Culture with 25℃ and 12-hr daylength for 21 days.

Table 4. Conidia formation for five strains of *F. graminearum* at different temperatures

Strain	Temperature (°C)					Mean
	10	15	20	25	30	
21	0	0	0	0	0	0
78	0.5	1.0	1.0	2.0	1.0	1.1
G 6	0	0	0	0	0	0
1361	0.5	1.5	2.0	2.5	4.0	2.1
S 1	0	0	0	0	0	0
Mean	0.2	0.5	0.6	0.9	1.0	0.6

PDA plate culture with 12-hr daylength for 21 days.

Table 5. Conidia formation for five strains of *F. graminearum* in different daylength

Strain	Daylength (hour)			Mean
	0	12	24	
21	0	0	0	0
78	1.5	3.5	3.0	2.7
G 6	0	0	0	0
1361	4.0	4.0	4.0	4.0
S 1	0	0	0	0
Mean	1.1	1.5	1.4	1.3

PDA plate culture with 25°C for 21 days.

るとしており、本実験の結果もこれとほぼ一致した。

実験 3. 日長条件

Table 5 に各菌株の 3 つの日長条件における分生子形成指数を示す。実験 2 と同様に No. 78 と 1361 はいずれの条件でも分生子を形成し、他の菌株は形成しなかった。

No. 1361 はいずれの条件でも安定して多量の分生子を形成し、この菌株では日長条件と分生子形成が無関係とみられた。また、No. 78 は暗黒条件で分生子形成量が少なく、12 時間日長でやや多かった。このように、本実験の供試菌株では日長条件が分生子形成に及ぼす効果は余り顕著ではないが、以後の実験では日長を 12 時間とすることにした。

多くの糸状菌では光が孢子形成と密接な関係をもつことが知られてる。例えば、本田 (1979) は孢子形成の波長依存性を解析し、それらを 6 種の反応型に分類しているが、ムギ類赤かび病菌の光反応については説明されておらず、詳細な研究が必要と思われる。

実験 4. 菌糸除去処理

イネのいもち病菌では培養中の菌糸の除去処理が分生子形成を促進することが知られている。このような処理が赤かび病菌に対しても有効かどうかを検討するために Table 6 に示す 6 菌株を供試して菌糸除去処理の効果を検討した。

その結果、菌糸の除去処理を行っても分生子形成能力の低い菌株では分生子が形成されず、また、分生子形成能力の高い菌株では分生子形成量が無処理区とほとんど変わらず、菌糸除去処理の効果は認められなかった。なお、No. 1361 は菌糸除去当日、すなわち培養

Table 6 . Effect of hyphae removal for conidia formation in six strains of *F. graminearum*

Strain	Days after treatment									
	0		1		3		5		7	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	0	0	0	1.0	1.0	1.5	3.5	3.5	4.0	4.0
G 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1361	3.0	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
S 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H27	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	1.0
Mean	0.5	0.5	0.7	0.8	0.8	0.9	1.3	1.3	1.4	1.5

PDA plate culture with 25°C and 12-hr daylength.

+: Hyphae removal at the fourth day of first culture.

-: Control.

Table 7 . Effect of changing medium from PDA to water agar in six strains of *F. graminearum*

Strain	Days after treatment									
	0		1		3		5		7	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	0	0	0.5	0.5	4.0	2.5	3.0	3.0	4.0	4.0
G 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1361	3.0	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
S 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H27	0	0	0	0	0	0	3.0	0	4.0	0
Mean	0.5	0.5	0.8	0.8	1.3	1.1	1.7	1.2	2.0	1.3

PDA plate culture with 25°C and 12-hr daylength.

+: Changing from PDA to water agar at the sixth day of first culture.

-: Control (changing from PDA to PDA).

開始後4日目ですでに分生子形成指数が3に達しており、分生子形成が極めて早い菌株として注目される。

実験5. 培養中の培地条件の変更処理

一般に、フザリウム菌の分生子は栄養条件や環境条件が比較的良好なときに形成されるとされている。しかし、分生子形成能力の低い菌株においては PDA 培地などでは栄養過剰のため菌糸のみが伸長し、分生子が形成されないのではないかと考え、培養中に培地の栄養条件を変える処理を試みた。

その結果を Table 7 に示す。分生子形成能力の高い No. 78 および 1361 の 2 菌株では、処理効果はほとんど見られなかった。また、形成能力の低い No. 21, G 6 および S 1 の 3 菌株では分生子の形成は全く認められず、培地条件を途中で変更してもこれらの菌株は分生子を形成しなかった。一方、H27 は PDA 培地で連続して培養した場合には全く分生子を形成しないにもかかわらず、素寒天培地に変えてから7日目、すなわち培養開始13日目

には分生子形成指数が4と最高値に達した。なお、この菌株を PDA 培地で21日間培養した場合の分生子形成指数は2.5にすぎず (Table 3), 培地変更処理による分生子形成の促進効果は明らかであった。

このように、栄養条件と分生子形成の関係は菌株によって異なり、No. 1361のように栄養条件が良くても分生子を形成する菌株や、H27のように栄養条件が悪くなると分生子を形成する菌株、S1のように、栄養条件が悪くなっても分生子を形成しない菌株などがあることが明かになった。

実験6. 液体振盪培養における培地条件

PDA 培地などを用いた平面培養ではNo. 78や1361などのように分生子形成能力の高い菌株では比較的容易に分生子を得ることができたが、H27や H45などのように分生子形成能力のやや低い菌株で多量の分生子を得るためには培地条件や培養法を工夫しなければならない。

また、平面培養法は接種試験などに用いる孢子懸濁液を大量に作製する場合には大きな労力を必要とし、必ずしも簡便大量培養法とはいえない。そこでより簡単にかつ大量の分生子を得ることを目的として液体培地による振盪培養を試みた。

まず、振盪培養に好適な培地を知るために5種類の培地で分生子形成量を調査した。その結果を Table 8 に示す。供試した培地の中では見里・原の培地が最もよく分生子を形成し、ついで改変ペプトン、改変 Bilai, PD, Park の培地の順であった。Table 3 と比べると、平面培養では全く分生子が形成されなかった改変 Bilai の培地が振盪培養では良く分生子を作ること、その反面、平面培地ではそれなりに分生子が形成された Park の培地が振盪培養ではほとんど分生子を形成しないことなどが注目される。なお、平面培養で分生子を形成しない菌株は振盪培養でも分生子を形成せず、分生子形成能力は遺伝的形質であることが強く示唆された。

また、改変 Bilai の培地と Park の培地では平面培養と同様に菌糸の伸長量が他の培地に比べて極めて少なかった。特に改変 Bilai の培地は菌糸の伸長がほとんど見られないに

Table 8. Conidia formation by liquid shake culture for ten strains of *F. gymmearum* in five media

Strain	Media					Mean
	PD	Pepton	Park	Bilai	M.H.	
21	0	1	0	0	1	0.4
50	0	0	0	0	1	0.2
78	4	4	1	4	4	3.4
G 6	0	0	0	0	0	0
G 9	3	3	0	3	4	2.6
1360	0	0	0	0	0	0
1361	4	4	0	3	4	3.0
S 1	0	0	0	0	0	0
H27	0	4	3	3	4	2.8
H45	1	4	1	4	4	2.8
Mean	1.2	2.0	0.5	1.7	2.2	1.4

Culture with 25°C, 12-hr daylength and 135rpm shaking speed for 14 days.

もかわらず、分生子形成は PD よりも優れ、見里・原およびペプトン培地に比適するものであった。改変 Bilai の培地において菌糸の伸長が極めて少ないことは孢子懸濁液の調整や孢子の発芽試験を行う際に菌糸の除去が簡単にできるので、非常に利点である。以上のことから改変 Bilai の培地は振盪培養に好適な培地と思われたので、以後の実験にはこれを用いた。

実験 7. 振盪速度

Table 9 にはそれぞれの振盪速度で 1 週間振盪培養した場合の分生子形成指数を示した。また、Fig. 1 には分生子形成能力の高い No. 78, G 9, 1361, H27 および H45 の 5 菌株の平均分生子形成指数の経時変化を振盪速度別に示した。振盪速度が早くなるほど分生子の形成が促進される傾向が認められたが振盪速度が 0、すなわち静置培養の場合でも培養の後期には相当量の分生子が形成された。

これらの結果から培養期間を長くすれば必ずしも振盪する必要はないとみられるが、135 rpm 程度の振盪を与える方が短期間で多量の分生子が得られることが明らかになった。培養期間が短いということは形成された分生子の熟度がそれだけ揃っていることを意味するので、耐病性を検定する際などには大きな利点と考えられる。

実験 8. 液体培地の pH

フザリウム菌の場合、生育可能な pH の範囲は 2.6~10.2 と広く、最適 pH は 6~8 の間にあるとされている (木谷ら 1957)。

齊藤・堀 (1985) は赤かび病菌の分生子形成における最適 pH は菌株により異なるが、概ね 6 前後の弱酸性域にあるとしている。

今までの実験はすべて pH 未調整 (pH 5~6) で行ってきたので、pH 条件の分生子形成に及ぼす効果を検討した。

その結果を Table 10 に示す。分生子形成能力の高い No. 78, 1361 および H45 は、pH 5~10 の広い範囲で大量の分生子を形成した。さらに、今までの実験ではほとんど分生子を形成しなかった No. 21 と 1360 も pH 7~10 では分生子を形成し、pH 10 では両菌株とも分生子形成量が極めて多かった。しかし、G 6 と S 1 はいずれの pH でも分生子を形成し

Table 9. Conidia formation for nine strains of *F. graminearum* in different shaking speeds

Strain	Shaking speed (rpm)				Mean
	0	60	90	135	
21	0.5	0	3.0	3.0	1.6
78	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
G 6	0	0	0	0	0
G 9	3.0	3.0	3.0	4.0	3.3
1360	1.5	0	0	0	0.4
1361	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
S 1	0	0	0	0	0
H27	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
H45	3.0	2.0	3.0	4.0	3.0
Mean	2.2	1.9	2.3	2.6	2.3

Modified Bilai's liquid culture with 25°C and 12-hr daylength for seven days.

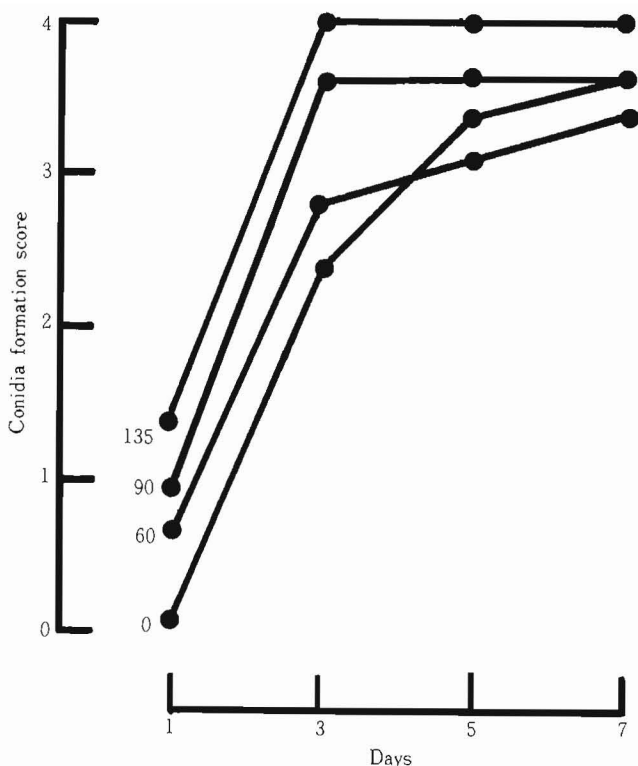


Fig. 1 . Conidia formation for the first seven days by liquid culture with four different shaking speeds (average of five strains).

Table 10. Conidia formation for seven strains of *F. graminearum* at different pH levels

Strain	pH							Mean
	3	5	6	7	8	10	12	
21	0	0.5	2.0	3.0	4.0	4.0	0	1.9
78	1.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	0	3.0
G 6	0	0	0	0	0	0	0	0
1360	0	0	0	1.0	3.0	4.0	0	1.1
1361	1.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	0	3.0
S 1	0	0	0	0	0	0	0	0
H45	1.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.5	0	2.9
Mean	0.4	1.8	2.0	2.3	2.7	2.8	0	1.7

Modified Bilal's liquid culture with 25°C, 12hr day length and 135rpm shaking speed.

なかった。また、pH12ではいずれの菌株でも分生子が形成されず、pH 3 でも形成量が非常に少なかった。

以上のことから、赤かび病菌では分生子形成におよぼす pH の効果は菌株によって異なる。

り、分生子形成可能な pH の範囲が非常に広い菌株と、比較的限られた菌株、また pH を変えても全く分生子を形成しない菌株があることが明かとなった。より多くの菌株に分生子を形成させるという意味では pH 8～10が適当と考えられる。

実験 9. 菌株間差異

振盪培養法は平面培養よりも短期間に大量の分生子を形成できる方法であるが、今までの実験では供試菌株が少なかったので本培養法が赤かび病菌全般に対して有効であるかどうかを知るために、多数の菌株を用いて平面培養と振盪培養の結果を比較した。また振盪培養においては、先の実験で弱アルカリ性の方が分生子形成に適しているとみられたので、培地の pH を 8 に調整した区と無調整の区を設け、pH 条件の効果も併せて検討した。

Fig. 2-A に PDA 平面培地で培養した場合の75菌株の分生子形成指数の頻度分布を示す。なお、この分布は別の実験で約250菌株の分生子形成指数を調査した結果とよく似ており、これらの75菌株は当研究所で保存している赤かび病菌の分生子形成能力を代表しているとみて良い。

Fig. 2-B と Fig. 2-C には pH 無調整と pH を 8 に調整した改変 Bilai の培地で振盪培養した場合の分生子形成指数の頻度分布を示した。

分生子形成指数は平面培養で平均1.51、振盪培養では pH を調整した区としない区では差がなく、いずれも2.37であった。また、接種試験などに実用的に使用できる分生子量である指数 3 以上の菌株は PDA 平面培養では24菌株と全体の約 1/3 であるのに対して、pH 無調整の振盪培養では41菌株、同じく pH 8 の振盪培養で43菌株と半数を越えた。従って、振盪培養法の方が平面培養法よりも汎用性の高い培養法であると言える。

なお、pH 無調整 (pH 5～6) と pH 8 の区では平均値に差がなく、また両者間の相関係数も0.79と高かったのでこの程度の pH の差異は分生子形成に大きく影響しないとみられた。

実験 1～9 の結果を総合すると、より多くの菌株に熟度の揃った大量の分生子を形成させるには、pH 8～10に調整した改変 Bilai の液体培地を用いて25℃、12時間日長、135rpm で振盪培養するのが適当とみられた。

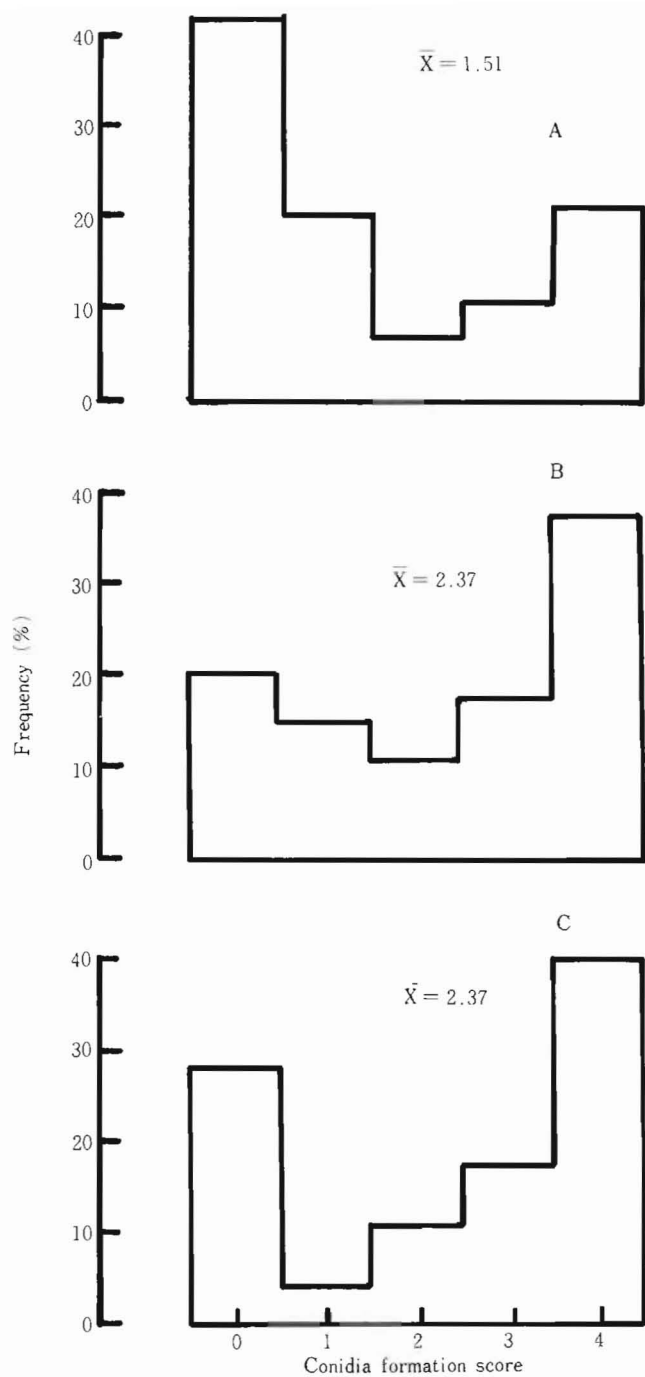


Fig. 2. Frequency distribution of conidia formation score in 75 strains.

A : Plate culture by PDA medium

B : Liquid culture by modified Bilai's medium (pH 5-6)

C : Liquid culture by modified Bilai's medium (pH 8)

摘

要

ムギ類赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*) の分生子を簡便かつ大量に得ることのできる培養法を開発するために、分生子形成におよぼす温度、日長、培地条件および培養方法などの効果を検討した。結果の概要は以下の通りである。

1) 平面培養では見里・原、改変ペプトン、ジャガイモ煎汁および Park の培地を使って 25℃、12時間日長で培養するのが適当とみられた。菌糸除去処理は有効ではなかったが、培地変更処理は一部の菌株で有効であった。

2) 振盪培養では平面培養よりも短期間に大量の分生子を得ることができた。改変 Bilai の培地は、分生子の形成が多い割には菌糸の伸長が少なく、振盪培養に好適な培地とみられた。振盪速度および培地の pH の差異は一部の菌株で顕著な効果を示し、135rpm, pH 8~10が適当とみられた。

3) 75菌株の分生子形成を平面培養と振盪培養で比較した結果、振盪培養した方が多くの菌株で大量の分生子を形成させることができた。

4) より多くの菌株に熟度の揃った大量の分生子を短期間で形成させるには pH 8~10に調整した改変 Bilai の液体培地を用いて 25℃、12時間日長、135rpm で振盪培養するのが適当とみられた。しかしながら、培養方法、培地、温度、日長などを変えても分生子を形成しない菌株があり、赤かび病菌の分生子形成能力は遺伝的特性とみられた。

引 用 文 献

- 部田英雄, 1990, ムギ類赤かび病菌子のう殻の形成ならびに保存法, 資源生物機能の解析と制御に関する研究 (昭和62~平成元年度 文部省特定研究成果報告書): 35-39.
- 本田雄一, 1979, 糸状菌の胞子形成と光条件, 植物防疫 33: 430-438.
- 一戸正勝, 1978, *Fusarium* 属菌の産生するマイコトキシン, 植物防疫 32: 417-422.
- 井上成信・西門義一, 1959, 麦赤かび病に関する生態学的研究 第1報 子のう胞子の飛散と一次感染の時期について, 農学研究 46: 164-179.
- Joffe, A. Z. 1963. The mycoflora of continuously cropped soil in Israel, with special reference to effect of manuring and fertilizing. Mycologia 55: 271-282.
- 木谷清美・井上好之利・夏目孝男, 1957, トマト萎凋病に関する研究, 第1報 病原菌およびその性質, 四国農業試験場報告 3: 151-162.
- 見里朝正・原 薫, 1957, 稲熱病菌胞子形成培地について, 農業および園芸 33: 797-798.
- 西門義一, 1958, コムギアカカビ病防除に関する研究, 農業改良技術資料 97: 1-162.
- Park, D. 1961. Morphogenesis, fungistasis and cultural staling in *Fusarium oxysporum* Syder and Hansen. Trans. Brit. Mycol. Soc. 44: 377-390.
- Pugh, G. W., H. Johann, and J. G. Dickson 1933. Factors affecting infection of wheat heads by *Gibberella saubinetii*. J. Agr. Res. 46: 771-797.
- 齊藤初雄・堀 真雄, 1985, ムギ類赤かび病の発生生態と防除に関する研究. I: 赤かび病菌分生子の大量培養法, 中国農業試験場報告 E22: 1~19.
- 武田和義, 1990, オオムギにおける赤かび病耐病性の選抜反応と親子相関, 育種 40: 91-101.
- 武田和義・部田英雄, 1989, オオムギにおける赤かび病検定法の開発と耐病性品種の検索, 育種 39: 203-216.

A Method for Mass Sporulation in a Scab Disease Pathogen (*Fusarium graminearum* Schwabe)

Ryoichi KANATANI and Kazuyosi TAKEDA

Summary

For screening genotypes resistant to fungous pathogens by artificial inoculation method, it is very important to obtain abundant spores of the pathogens. To develop a technique for mass sporulation, the effects of temperature, daylength, medium, and culture method on conidia formation were investigated using *Fusarium graminearum* which causes wheat and barley scab.

1) By plate culture, conidia were formed abundantly at around 25°C, 12-hr daylength in potato dextrose agar, Misato-Hara, modified Pepton and Park's medium. Modified Bilai's medium was not suitable for plate culture because of poor hyphae growth. Hyphae removal was not effective for conidia formation, but the treatment changing medium during the cultivation was effective in some strains.

2) By liquid shake culture, the abundant conidia were obtained in shorter time compared to plate culture. Modified Bilai's medium was most suitable because it developed abundant conidia but poor hyphae. Shaking speed and pH of medium affected the conidia formation in some strains; 135rpm and pH 8-10 seemed to be optimum.

3) A total of 75 strains were evaluated for sporulation ability under the plate and liquid shake culture. The liquid shake culture was more suitable for conidia formation than plate culture.

4) For mass sporulation, liquid shake culture by modified Bilai's medium (pH 8-10) with 25°C, 12-hr daylength and 135rpm shaking speed was most suitable. However sporulation largely depended upon the genetic ability of the strain, and some strains never developed conidia in all conditions tested.